

Universidade Federal de São Paulo

Renan Pozzi

**Instabilidade genética induzida pelo exercício
físico em múltiplos órgãos de ratos Wistar**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Santos

2010

Universidade Federal de São Paulo

Renan Pozzi

**Instabilidade genética induzida pelo exercício
físico em múltiplos órgãos de ratos Wistar**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de São Paulo como
parte dos requisitos para obtenção do título
de bacharel em Educação Física -
modalidade saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Colaboradores:

Profa. Dra. Lilá Missae Oyama

Ricardo Eguchi

Santos

2010

Instabilidade genética induzida pelo exercício físico em múltiplos órgãos de ratos Wistar

Renan Pozzi

Aprovado em ____ de _____ de 2010.

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Prof. Dr. Ricardo José Gomes

Prof. Dr. Sionaldo Eduardo Ferreira

Santos

2010

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar danos genéticos induzidos pelo exercício agudo até a exaustão em modelo animal por meio do teste de células individualizadas em gel de agarose (teste do cometa). Ratos Wistar adultos machos foram distribuídos em 2 (dois) grupos: grupo controle e exercício (experimental). Um total de 15 (quinze) animais acondicionados a corrida (adaptação) em esteira por 15 (quinze) minutos por dia durante 5 (cinco) dias (10 m/min; 8° de inclinação). Após isso, os mesmos foram submetidos à corrida em esteira à (10m/min, 8° de inclinação) por 10 minutos, para aquecimento seguido por 40 minutos à (22m/min, 58° de inclinação), aumentando sua carga em (1 m/min) a cada minuto, até a exaustão. Findando o protocolo células do sangue, fígado, coração e cérebro foram coletadas em 0 (zero), 2 (duas) e 6 (seis) horas após o exercício. Os resultados mostram que o exercício foi capaz de induzir danos no DNA em sangue periférico após 2 (duas) e 6 (seis) horas. No fígado, houve um aumento de danos no DNA em todos os momentos avaliados. Contudo o exercício não foi capaz de causar danos genéticos em células cerebrais e do coração. Em suma, nossos resultados sugerem que o exercício físico agudo praticado até a exaustão contribuiu para danos genéticos no sangue e fígado, conforme detectado pelo teste do cometa.

Palavras Chaves: Exercício agudo, teste do cometa, danos no DNA, ratos.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate if acute exercise is able to induce genetic damage in a short-term assay by means of single cell gel (comet) assay. Male adult Wistar rats were distributed into two groups: control and acute exercised (experimental). A total of fifteen animals were accustomed to run on a rodent treadmill for 15 min per day for 5 days (10 m/min; 8 grade). After 1 day, the rats were submitted to a rodent treadmill (10 m/min, 8 graus) for 10 minutes and during 40 minutes (22 m/min; 58 grade) raised the charge (1 m/min) every minute, until exhaustion. Cells from peripheral blood, liver, heart and brain were collected after 0, 2 and 6 hours after exercise. The results showed that acute exercise was able to induce genetic damage in peripheral blood cells after 2 and 6 hours of exercise. Liver pointed out genetic damage for all periods evaluated. There is not genetic damage either in brain or in heart cells. In conclusion, our results suggest that acute physical exercise could contribute to the genetic damage in peripheral blood and liver cells.

Keywords: acute exercise, single cell gel (comet) assay, DNA damage, rats.

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
Sumário.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1. ANIMAIS.....	6
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	7
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	7
3.3.1. PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	7
3.3.2. SACRIFÍCIO	8
3.4. ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE	8
3.4.1. TESTE DE CÉLULAS INDIVIDUAIS EM GEL DE AGAROSE (TESTE DO COMETA)	8
3.4.2. CAPTAÇÃO DE COMETAS E ANÁLISES	9
3.4.3. Análise estatística.....	10
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
Anexo-1	23
Anexo-2.....	24

1. INTRODUÇÃO

A inatividade física e consequentemente o baixo nível de condicionamento físico têm sido considerados fatores de risco para mortalidade precoce (BLAIR et. al., 1996). Estudos epidemiológicos têm demonstrado forte relação entre inatividade física e presença de fatores de risco cardiovascular, como hipertensão, antecedentes familiares (RENNIE et. al., 2003). Por outro lado, a prática regular de atividade física tem sido recomendada para a prevenção e tratamento de doenças e seus fatores de risco, especialmente às crônicas (PATE et. al., 2003).

Recentemente foi demonstrado que a prática do exercício físico realizado entre 30 a 70 % do consumo de oxigênio máximo ($VO_2\text{max}$), por 30 a 60 minutos estimula a expressão de óxido nítrico (NO), principal vasodilatador, em células musculares de roedores, pela via fator de transcrição $NFK\beta$. O mesmo estudo observou aumento significativo na produção de H_2O_2 e da fagocitose (ZALDIVAR et. al., 2006).

Contudo, quando o exercício físico é praticado em intensidades elevadas (maior que 70 % do $VO_2\text{max}$) pode levar a um quadro de imunodepressão, principalmente pela elevação dos hormônios contra regulatórios, principalmente o cortisol. Nesse sentido, foi proposto que o exercício físico apresenta uma relação em “U” invertido, ou seja, quando é praticado de forma moderada prepara o organismo para se defender contra agentes estressores, entretanto e quando praticado em intensidades elevadas, ele promove situações

imunossupressoras semelhantes ao indivíduo sedentário (ZALDIVAR et. al., 2006).

Dentre os benefícios do exercício físico regular, também encontramos diversos trabalhos sobre a importância do exercício físico sobre o sistema antioxidante (MANNA et. al., 2004). As enzimas malondialdeído (MDA), glutathione redutase (GSH) são responsáveis pela redução das espécies reativas de oxigênio e por anular seus efeitos contra a membrana celular (DI MEO & VENDITTI, 2001).

De fato, o exercício físico pode otimizar o consumo de oxigênio dependente da intensidade almejada, que está associada com aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (DAVIEW et. al., 1982). O exercício físico agudo é bem conhecido por aumentar o fluxo de sangue e oxigênio no pulmão, que podem levar, por sua vez, a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DAVIES et. al., 1982) e resultar em danos oxidativos em tecidos contrateis (DAVIES et. al., 1982; RADA'K et. al., 1995) e nos pulmões (RADA'K et. al., 1995).

Enquanto o exercício moderado realça as funções imunológicas, um período de exercício exaustivo (treinamento mais intenso) produz um efeito antagônico, enfraquecendo a primeira linha de defesa do organismo contra as infecções (BRUUNSGAARD H, et. al., 1997; KAJUURA JÁ et. al., 1995; KOPPEL M, et. al., 1998; MACKINNON LT, JENKINS DG, 2000; SHEPHARD J-A, et. al., 1995; WEINSTOCK C, et. al., 1997). Já no exercício exaustivo, citocinas e vários hormônios relacionados ao estresse (adrenalina, GH, cortisol, beta-endorfina) podem mediar a depressão transitória das defesas imunes

inatas (células NK e atividades dos neutrófilos) e adaptativas (funções das células T e B) do organismo (BAUM et. al., 1997; NEIMAN, 1997).

Os esforços de alta magnitude estimulam a redistribuição do fluxo sanguíneo, provocando hipóxia e re-oxigenação, que podem aumentar os níveis do radical anion superóxido pela xantina oxidase, oxidase HAD(P)H e autoxidação de mioglobina (VINA et. al., 2000; GUNTHER et. al., 1999; OLEK et. al., 2005). Radicais livres advindos de neutrófilos desempenham importante papel na degradação de tecidos vivos (JI, 1999). O excesso relativo de oxidantes endógenos também é responsável pelo dano tecidual, pela inativação enzimática, peroxidação lipídica e pelas quebras de fita de DNA (WIERZBA et. al., 2006).

Apesar de todos esses efeitos promovidos pela atividade física serem amplamente documentados, dados controversos foram publicados na literatura no que tange aos marcadores de oxidação genômica em células eucarióticas expostas ao exercício físico até o presente momento (SELMAN et. al., 2002).

O decréscimo de peroxidação lipídica foi observado em camundongos submetidos à natação de forma crônica (PEREIRA et. al., 1994), enquanto que efeito oposto foi verificado em camundongos exercitados de forma aguda em treino de corrida (AZENABOR et. al., 1999). Há certo consenso de que a prática maciça do exercício físico seja capaz de promover danos genéticos em leucócitos (TSAI et. al., 2001; HARTMANN et. al., 1995). Isso é respaldado em estudos que demonstraram que os seres humanos submetidos a exercícios anaeróbios desencadearam intenso dano genético em linfócitos periféricos

(MOLLER et. al., 2001), bem como em maratonistas (HARTMANN et. al., 1994; RADAK et. al., 2000).

Dessa forma, seria interessante saber se a atividade física intensa poderia desencadear instabilidade genética em múltiplos órgãos, particularmente porque não há estudos que relacionem com precisão a instabilidade genética global induzida por exercícios físicos.

A técnica que utiliza células individualizadas em gel (teste do cometa) permite que a integridade do material genético seja avaliada em todas as etapas da carcinogênese. Rydberg & Johanson (1978), utilizando técnicas bioquímicas, foram os pioneiros na quantificação de danos no DNA em células individualizadas. Mais tarde, Ostling & Johanson (1984) introduziram modificações na metodologia, em que células individualizadas, embebidas em agarose eram colocadas sobre uma lâmina de microscópio, lisadas por detergentes e altas concentrações de sais e expostas à eletroforese sob condições neutras. As células com frequência aumentada de quebras de cadeia dupla de DNA apresentavam maior migração da molécula em direção ao ânodo, permitindo a visualização de uma “cauda” ao exame microscópico, após coloração com um agente intercalante fluorescente (brometo de etídio). Devido a essa aparência, a imagem resultante foi denominada de “cometa”, o que levou Olive (1989) a sugerir o nome de “comet assay” (teste do cometa) para identificar o teste, também conhecido por ‘single cell gel electrophoresis assay.

A interpretação dos resultados é feita a partir dos cometas, sendo dividido em duas partes: cabeça e cauda. Células com pouco dano no DNA

apresentam pouca ou nenhuma cauda e possuem aparência similar a nucleóides, enquanto as células com o DNA danificado apresentam caudas mais evidentes e longas. O tamanho, a intensidade da fluorescência, o aspecto, a forma, bem como outras características dos cometas são mensuradas visualmente por meio de “scores” ou mesmo por programas específicos de análise de imagem (TICE et. al., 2000).

O uso de condições neutras para a eletroforese era um fator limitante do teste, uma vez que permitia apenas a detecção de quebras de cadeia dupla de DNA. Deste modo, SINGH et. al., (1988) propuseram que a eletroforese fosse conduzida em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), o que permitiu a detecção de quebras de fita simples e de sítios álcali-labeis no DNA. Atualmente, desde lesões primárias no DNA, a eficiência de seu sistema de reparo, até a discriminação de células apoptóticas de necróticas vêm sendo estudados por meio do teste (RUNDELL et. al., 2004).

Além das vantagens citadas e do baixo custo, o teste do cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA (MONTEITH & VANSTONE, 1995), por requerer células viáveis, mas não em divisão, sendo, portanto, aplicável a qualquer tipo de tecido do qual, células vivas possam ser obtidas. Em virtude do teste do cometa possibilitar o acesso a quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são necessárias para análise.

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo aplicar o teste do cometa para investigar os danos genômicos associados ao exercício físico agudo utilizando o modelo animal. Portanto, proporcionará o conhecimento do grau de danos ao DNA como biomarcador em diferentes fases após o exercício agudo em vários órgãos de ratos Wistar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso inicial entre 150-200g, mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) no biotério do Departamento de Biociências (UNIFESP), Campus Baixada Santista.

A sala foi mantida em ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do período claro às 07:00 hs. A temperatura e umidade relativa do ar foram controladas em 22 ± 2 °C e $60 \pm 5\%$ de umidade local, respectivamente, e os animais tiveram acesso à água e ração *ad Libitum*. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (protocolo número CEP 1291/09), (anexo-1).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 2 grupos, contendo 15 animais por grupo em três momentos de sacrifício (zero, duas e seis horas após o exercício).

- Grupo sedentário (controle);
- Grupo submetido à Exercício Físico (experimental).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento físico de corrida em esteira de acordo com adaptação do protocolo de BANZET et. al., (2007). Antes do treinamento propriamente dito, todos os animais do grupo experimental foram submetidos à atividade física para a adaptação à corrida na esteira por 15 minutos por dia durante 5 dias (10 m/min; 8° de inclinação). Após isso, os mesmos correram na esteira à (10m/min, 8° de inclinação) por 10 minutos, para aquecimento e 40 minutos à (22m/min, 58° de inclinação), aumentando sua carga em (1 m/min) a cada minuto após esses 40 minutos, até a exaustão do animal.

3.3.2. SACRIFÍCIO

Os animais foram sacrificados com superdosagem de anestésico Ketamina (Fort Dodge, USA) a 5% acrescido de Xilazina a 2%, logo após o treinamento (momento zero), 2 e 6 horas após realizarem o exercício físico. Os animais do grupo controle foram sacrificados concomitantemente aos ratos do grupo experimental. Para cada momento de sacrifício, foi utilizado um total de 5 animais para ambos os grupos (15 animais por grupo).

3.4. ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE

3.4.1. TESTE DE CÉLULAS INDIVIDUAIS EM GEL DE AGAROSE (TESTE DO COMETA)

O protocolo do teste do cometa utilizado para células do sangue periférico, fígado, cérebro e coração segue as orientações propostas por TICE et. al., (2000) com algumas modificações. Um total de 10 μ L de sangue periférico e os fragmentos centrais desses órgãos foram coletados e macerados em 0,9% NaCl utilizando espátula de madeira. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 800 rpm durante 5 min e adicionado a 120 μ L de baixo ponto de fusão agarose (0,5%) a 37°C, e recobertos por lamínula. Após breve solidificação no refrigerador convencional, a lamínula, foi removida, sendo as lâminas então imersas em solução lise contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 10, 1% de sódio sarcosinate com 1% Triton X-

100 e 10% DMSO, durante o período de no mínimo 1 h. Antes de eletroforese, as lâminas ficaram em repouso em solução tampão alcalina (pH > 13) por 20 min, seguida por 20 min eletroforese a 0,7 V / cm, 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução tampão 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto e armazenadas até análise. O DNA foi corado pela adição de 100 µL de brometo de etídio (50 µg/mL) para cada lâmina. A fim de minimizar adicionais danos ao DNA a partir da radiação ultravioleta, todos os passos foram conduzidos com iluminação reduzida.

Controles positivos independentes a partir de células de sangue periférico, fígado, cérebro e coração foram gerados in vitro com 10 µg/mL MMS (metilmetasulfonato) por 30 min a 37° C, a fim de garantir a reprodutibilidade e sensibilidade do ensaio.

3.4.2. CAPTAÇÃO DE COMETAS E ANÁLISES

Um total de 50 cometas foram capturados aleatoriamente por animal (25 células de cada lâmina) analisado por um observador especializado a 400X ampliação, utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus) conectado através de uma câmera preto e branco a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II, Perspective Instruments Suffolk, Haverhill, UK), que foi anteriormente calibrado de acordo com instruções do fabricante.

O sistema de análise de imagem computadorizada adquiriu imagens, calculou a intensidade integrada para os perfis de cada célula, bem como as

estimativas do cometa aos componentes celulares e, em seguida, avaliou a gama de parâmetros derivados. Células incólumes possuem um núcleo intacto, sem cauda e células lesadas têm aparência de um cometa. Para medir os danos no DNA, dois parâmetros de análise do sistema de imagem foram considerados: intensidade da cauda (%DNA presente na cauda dos cometas) e momento da cauda (o produto do comprimento da cauda e da fração de DNA na cauda do cometa).

3.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos pelo teste do cometa foram avaliados estatisticamente com teste de Kruskal-Wallis não paramétricos, seguido pelo teste post-hoc Dunn's utilizando o Sigma Stat for Windows (Jadel Scientific, USA). Os valores estão expostos com média e \pm desvio padrão. O nível de significância foi fixado em $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) foram encontradas em células do sangue periférico do grupo experimental quando comparado ao grupo controle, em duas e seis horas após o exercício (figura 1). O fígado mostrou genocitotoxicidade em todos os momentos estudados (figura 2).

Ao contrário dos achados anteriores, o coração e cérebro, não sofreram nenhum tipo de dano genético, não havendo diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Tais resultados estão mostrados nas figuras 3 e 4, respectivamente.

As células dos ratos foram expostas ao MMS para garantir a sensibilidade do teste. A clareza dos resultados segue pela diferença estatística observada ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Ao longo do estudo nenhum animal morreu durante o experimento.

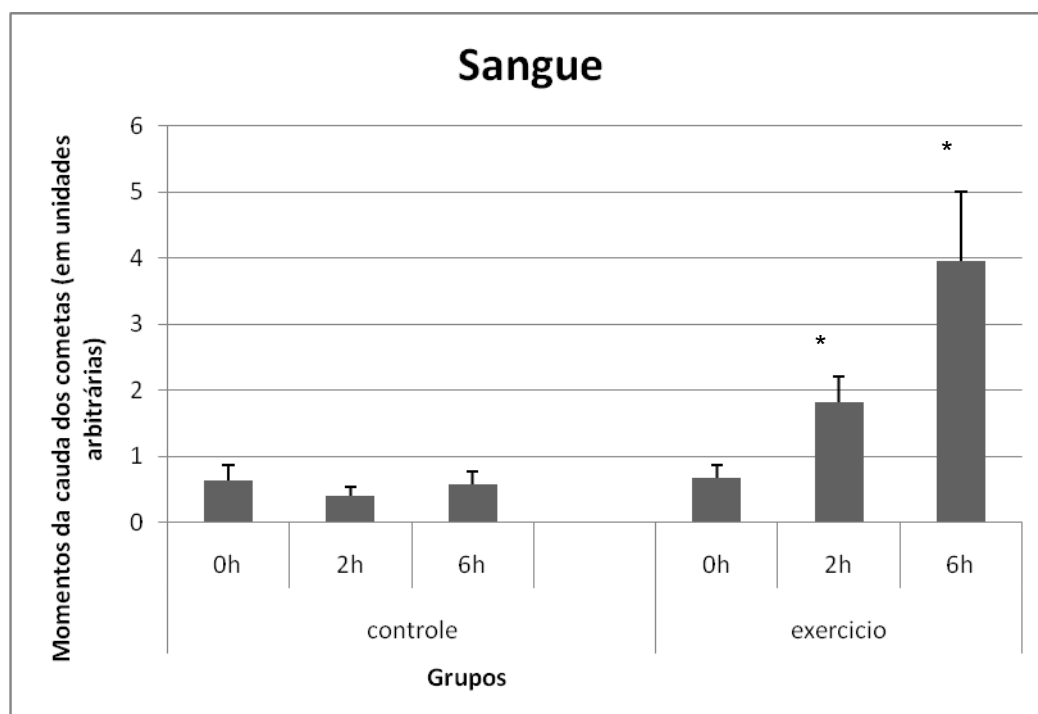


Figura 1: Danos no DNA em sangue periférico, induzidos pelo exercício agudo até a exaustão. Resultados são expressos como Media e D.P. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

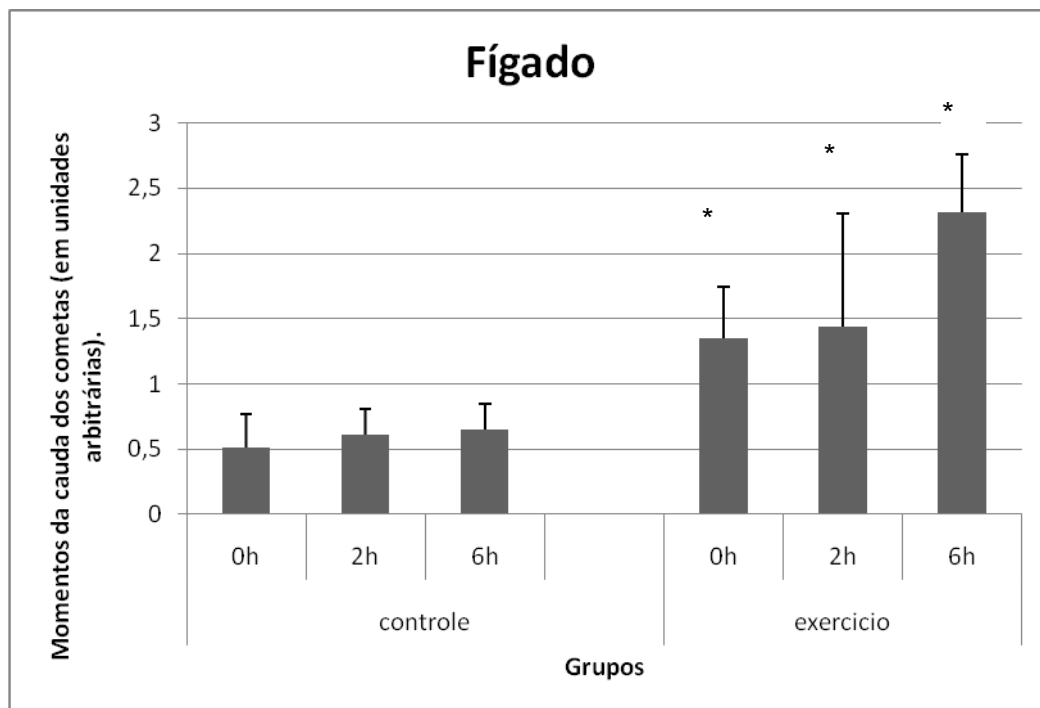


Figura 2: Danos no DNA no fígado, induzidos pelo exercício agudo até a exaustão. Resultados são expressos como Média e D.P. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

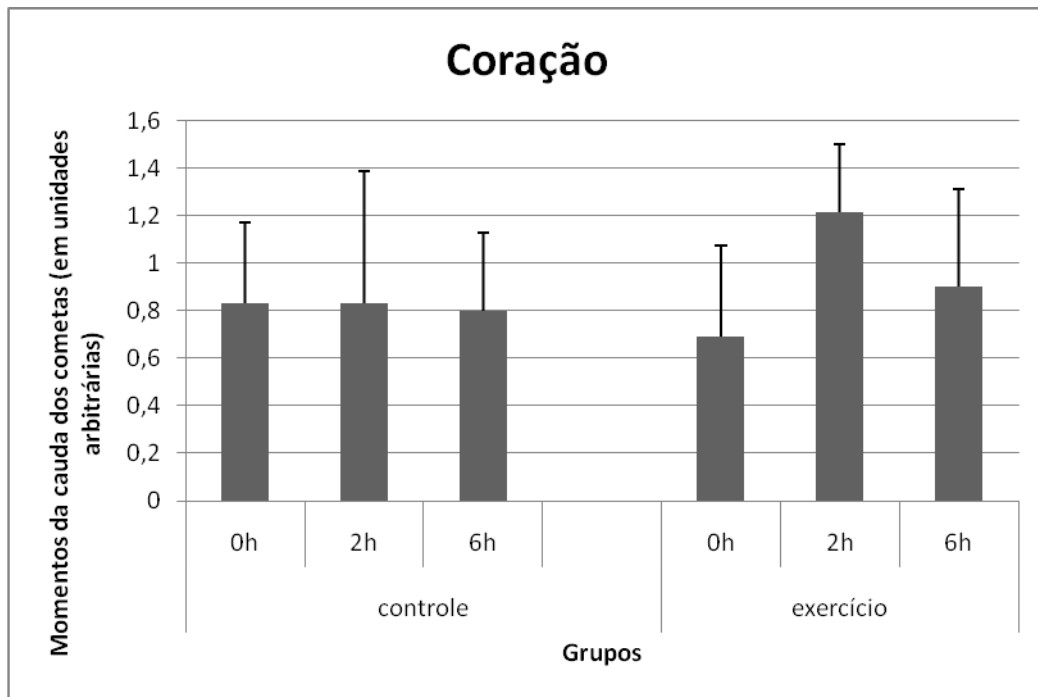


Figura 3: Danos no DNA no coração, induzidos pelo exercício agudo até a exaustão. Resultados são expressos como Media e D.P. $p > 0,05$

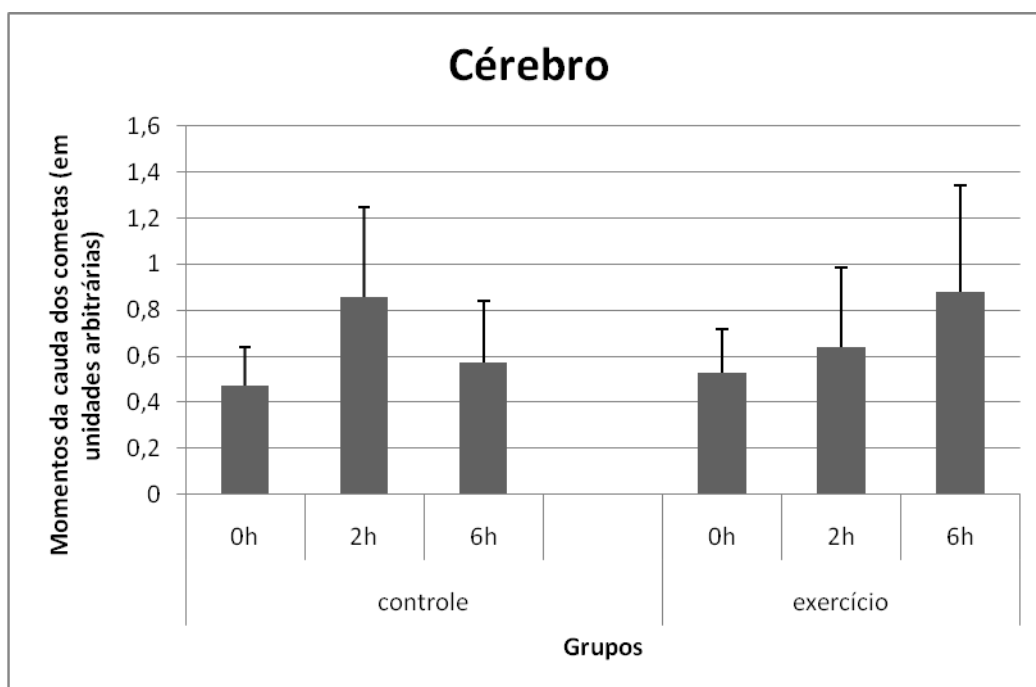


Figura 4: Danos no DNA no cérebro, induzidos pelo exercício agudo até a exaustão. Resultados são expressos como Media e D.P. $p > 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar danos genéticos induzidos pelo exercício físico agudo sobre múltiplos órgãos de ratos em diversos períodos.

Até o presente, existem poucos estudos, e com resultados conflitantes, sobre o dano oxidativo ou a capacidade antioxidante do cérebro (SUSUKI et. al., 1983; SOMANI et. al., 1995; RADAK et. al., 1995). Susuki et. al., (1983) informou que o exercício voluntário aumentou a peroxidação lipídica no cérebro. Já Ogonosky et. al. (2005) relataram que o excesso de treinamento não foi capaz de induzir o estresse oxidativo nesse órgão, e, por conseguinte, induzir dano genotóxico. Nossos resultados demonstraram que não houve danos genéticos significativos neste órgão em todos os períodos experimentais avaliados.

Quando analisados os dados relativos ao coração, os resultados também foram negativos, visto que o exercício físico não conseguiu contribuir para genotoxicidade, Liu et. al. (2000), entretanto, sugeriram que exposições diárias ao exercício prolongado, pode causar algum dano devido ao elevado estresse oxidativo ocasionado pela prática física.

Foi demonstrado por Hartmann et. al., (1994), que o exercício anaeróbio pode resultar em danos ao DNA em células de sangue periférico, com um pico de 24 horas após o exercício, com retorno ao estado de normalidade após 72 horas. Hartmann et. al. (1994) também sugere que, há evidências que a

atividade física é capaz de induzir danos genéticos nas células do sangue periférico de seres humanos, Tais resultados são semelhantes ao presente estudo, uma vez que detectamos danos genéticos em ratos nos momentos de 2 e 6 horas após o exercício físico agudo.

Segundo estudo de Ohkuwa et. al., (2004), a hipóxia no exercício diminuiu os níveis de 8-OHdG no fígado comparados ao grupo controle. Esse resultado indicou que a hipóxia atenua danos no DNA do fígado. Seguindo esse raciocínio, Nakamishi et. al., (1995) apontou em seu estudo que o fígado é mais vulnerável que outros órgãos ao estresse oxidativo sob a hipóxia. Davies (1982) sugere que o exercício de *endurance* pode contribuir de 2 ou 3 vezes a concentração de radicais livres no fígado. Em nosso estudo, sugerimos que não apenas o exercício de *endurance* seja indutor danos ao fígado como demonstrado Davies (1982), mas também o exercício físico agudo exaustivo.

6. CONCLUSÃO

Em suma, o principal achado em nossa pesquisa foi de que o exercício físico agudo até a exaustão induz danos genéticos em células de sangue periférico e fígado de ratos, sendo o ultimo mais sensível ao estresse genotóxico induzido pela prática física até a exaustão.

Esses resultados devem ser considerados em praticantes de exercício físico intensa ou mesmo àqueles sem orientação de um profissional habilitado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. *J Appl Physiol*. 1988. 64:1333–1336.

Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998. 243:678–682.

Azenabor AA, Hoffman-Goetz L. Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocyte and splenocyte damage in acutely exercised mice. *J Appl Physiol*. 1999. 86:1823-1827.

Banzet S, Koulmann N, Sanchez H, Serrurier B, Peinnequin A, Alonso A, Bigard X. Contraction-induced interleukin-6 transcription in rat slow-type muscle is partly dependent on calcineurin activation. *J Cell Physiol*. 2007. 210:596-601.

Blair SN, Kampert JB, Kohl III HW, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 1996. 276:205-2010

Collins AR, Ai-Guo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995.366:69– 77.

Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1982. 107, 1198–1205.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982.107:1198-1205.

Di Meo S, Venditti P Mitochondria in exercise-induced oxidative stress Biol Signals Recept 2001. 10. 125-1240

Dusinska M, Vallova B, Usinyova M, Hladikova V, Smolkova B, Wsolova L, Raslova K, Collins AR. DNA damage and antioxidants: Fluctuations through the year in a central European population group. *Food Chem Toxicol*. 2002 40:1119–1123.

Gunther MR, Sampath V, Caughey WS. Potential. Roles of myoglobin autooxidation in myocardial, ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biomol Med* 1999. 26:1388-1395.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford. 1999. 1–35.

Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grünert-Fuchs M, Speit G. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*. 1994. 9:269-72.

Hartmann A, Niess Am, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit. G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res*. 1995. 346:195-202.

Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999. 222:283-292.

Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW. Brooks, G.A., Ames, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol*. 2000. 89:21-28.

Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*. 2004. 347:15–24

Manna I, Jana K, Samanta PK. Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male wistar rats: protective role of alphanatocopherol succinate. *Can J Appl Physiol*. 2004. 29(2): 172-185

Moller P, Loft S, Lundby C, Olsen NV. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J*. 2001.15: 1181-1186.

Monteith, DK, Vanstone, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutat Res*. 1995. 345: 97-103.

Olek RA, Antowiewicz J, Popiningis J, Gabbianelli R, Fedeli D, Facioni G. Pyruvate but no lactate prevents NADH-induced myoglobin oxidation. *Free Radic Biol Med*. 2005. 38:1484-1490.

Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster. *Spheroids Radiat Res*. 1989. 117: 79-92.

Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto, H, Goto S, Radák Z. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can. J. Appl. Physiol*. 2005. 30:186-195

Ostling O, Johanson, KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys. Res Commun*. 1984. 123: 291-298.

Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, et. al., Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for

Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. JAMA. 1995; 273:402-407.

Pereira B, Costa Rosa LF, Safi DA, Medeiros MHG, Curi R, Bechara EJJ. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercised trained rats. *Physiol Behav* 1994. 56:1095-1099.

Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Ohishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Acute bout of exercise does not alter the antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in rat hippocampus and cerebellum. *Pathophysiology*. 1995. 243–245.

Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Ohishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol*. 1995. 79: 129–135.

Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol*. 1998. 435: 439–441.

Radak Z, Pucsek J, Boros S, Josphal L, Taylor AW. Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci*. 2000. 66:1763-1767.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsek J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int*. 2001. 38:17–23.

Rennie KL, McCarthy N, Yazdgerdi S, Marmot M, Brunner E. Association of metabolic syndrome with both vigorous and moderate physical activity. *Int J Epidemiol* 2003; 32:600-606.

Rundell MS, Wagner ED, Plewa MJ. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ Mol Mutagen*. 2003. 42:61-67.

Rydberg B, Johanson KJ. Radiation-induced DNA strand breaks and their rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse *Radiat Res*. 1975. 64:281- 292.

Sies H. Oxidative stress: Introduction. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press. 1991. 213–224.

Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: the effects of short term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 2002. 401: 255-261.

Shephard RJ, Shek PN. Potential. Impact of physical activity and sport on the immune system. A brief review. *Br J Sports Med*. 1994. 28:247- 55.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988. 175:184-191.

Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effects of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* , 1995. 50: 635–639.

Suzuki M, Katamine S, Tatsumi S. Exercise induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J. Nutr. Sci Vitamin* 29. 1983, 141–151.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet. assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing *Environ Mol Mutag.* 2000. 35: 206-221.

Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, Kong CW. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1465-1472.

Viña J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardó FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* 2000. 49:539-544.

Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, Wilson LD, Cooper DM. Constitutive Pro- and Anti-inflammatory Cytokine and Growth Factor Response to Exercise in Leukocytes. *J Appl Physiol.* 2006. 100:1124-1133.

Anexo-1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 10-03-2010 13:15:45

Página 1/2

Nº = 3552

São Paulo, 11 de Setembro de 2009

CEP 1291/09

Ilmo(s). Sr(a).

Pesquisador(a) Daniel Araki Ribeiro

Co-Investigadores: Lila Missae Oayama; Ricardo Eguchi; Renan Pozzi; Daniel Araki Ribeiro

Disciplina/Departamento Patologia da

Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador (Recursos Próprios)

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:

'Instabilidade genética induzida pelo treinamento físico em múltiplos órgãos de ratos Wistar'

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

OBJETIVOS: Avaliar possíveis danos genéticos induzidos pela atividade física intensa em múltiplos órgãos de ratos Wistar por meio do teste em células individualizadas em gel de agarose (teste do cometa)

RESUMO: Estudo com 30 ratos Wistar, machos, 8 semanas. Anestésico: ketamina. Analgésico: xilazina. Eutanásia: superdosagem de anestésico. Os animais serão divididos em 2 grupos : grupo sedentário e grupo submetido à atividade física. Os animais serão submetidos a um protocolo de treinamento físico de corrida em esteira até exaustão, durante 4 dias. Os animais serão sacrificados em 3 momentos: zero, duas e seis horas e colhidos: sangue, fígado, cérebro e coração que serão utilizados no teste de células individualizadas em gel de agarose (teste do cometa)

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Estudos recentes tem revelado que a prática excessiva de exercícios físicos pode ocasionar danos nocivos a diversos sistemas celulares tais como o material genético. Este estudo visa avaliar possíveis danos genéticos induzidos pela atividade física intensa em múltiplos órgãos de ratos, detectados por meio do teste do cometa.

MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados.

DETALHAMENTO FINANCEIRA: Sem financiamento externo - R\$ 1500,00

CRONOGRAMA: 12 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Graduação

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 16/09/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o termino do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Anexo-2